

[8]



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ  
(РОСПАТЕНТ)

(19) RU (11)  
**2175972** (13) C2

(51) 7 C07H21/00,  
C08F220/56, G01N33/50

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Российской Федерации

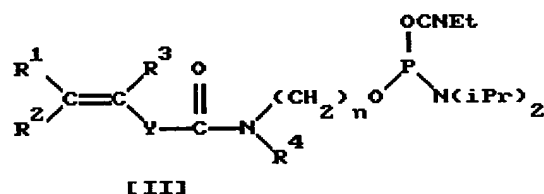
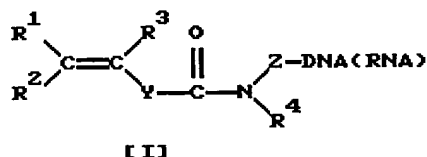
- (14) Дата публикации: 2001.11.20  
(21) Регистрационный номер заявки: 99127744/04  
(22) Дата подачи заявки: 1999.12.28  
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
1999.12.28  
(43) Дата публикации заявки: 2001.09.10  
(45) Опубликовано: 2001.11.20  
(56) Аналоги изобретения: 1. US 5932711 A, 03.08.1999.  
2. US 5981734 A, 09.11.1999. 3. ВАСИЛИСОВ В  
В.А. и др. Метод получения микрочипов с  
помощью сополимеризации с акриламидом. -  
Молекулярная биология, 1998, т. 32, № 5, с. 923-  
925. 4. DE 2260184 A, 11.07.1974. 5. КОРШАК В.В.  
и др. Полимеры в процессах иммобилизации и  
модификации природных соединений. - М.:  
Наука, 1984, с.34, 79 - 80, 83.

- (71) Имя заявителя: Институт  
молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта  
РАН  
(72) Имя изобретателя:  
Мирзабеков А.Д.;  
Рубина А.Ю.; Паньков  
С.В.; Чернов Б.К.  
(73) Имя патентообладателя:  
Институт молекулярной  
биологии им. В.А.  
Энгельгардта РАН  
(98) Адрес для переписки:  
119991, Москва, ГСП-1,  
ул.Вавилова, 32,  
Институт молекулярной  
биологии им.  
В.А.Энгельгардта, г-ну  
С.В.Панькову

### (54) СПОСОБ ИММОБИЛИЗАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ НЕПРЕДЕЛЬНЫЕ ГРУППЫ, В ПОЛИМЕРНЫХ ГИДРОГЕЛЯХ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ МИКРОЧИПА

Изобретение относится к способу иммобилизации олигонуклеотидов в полимерных гидрогелях, в том числе в полиакриламидном геле, при котором проводят сополимеризацию олигонуклеотидов, модифицированных непределными группами, общей формулы I с непределными мономерами, составляющими основу получаемого гидрогеля. Также изобретение относится к модифицированным олигонуклеотидам формулы I, в которой  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  представляют собой H, алкил  $C_1-C_6$ , Ph,  $PhCH_2$ ; Z представляет собой  $(CH_2)_n CH(CH_2OH)CH_2OX$ , где  $n=1-6$ ; или  $(CH_2)_n -OX$ , где  $n=2-6$ ; и X представляет собой фосфодиэфирную группу, связывающую непредельный фрагмент с 5'- и/или 3'-концом олигонуклеотида,  $R^4$  представляет собой H,  $(CH_2)_n OH$ , где  $n=2-6$ ; Y представляет собой  $(p-C_6H_4)_n$ , где  $n=0-2$ . Олигонуклеотиды модифицируют с помощью фосфоамида общей формулы II, где  $R^1$ ,  $R^2$  и Y такие, как в формуле I,  $R^3$  представляет собой алкил  $C_1-C_6$ ,  $R^4$  представляет собой H,  $(CH_2)_n -ODMT$ , где  $n=2-6$ ; или путем ацилирования олигонуклеотида,

содержащего аминолинк, активированным эфиром непердельной кислоты. Технический результат - высокая степень иммобилизации олигонуклеотидов в полимерном гидрогеле при формировании микрочипа. 2 с. и 16 з.п. ф-лы, 5 ил., 2 табл.



## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к молекулярной биологии и биоорганической химии и рассматривает олигонуклеотиды, модифицированные непердельными группами, способными вступать в реакцию сополимеризации с непердельными мономерами при формировании полимерных гидрогелей, а также способы их синтеза и способ проведения сополимеризации. Изобретение также относится к способу иммобилизации олигонуклеотидов в гидрогелях, получаемых полимеризацией непердельных мономеров акриламида и бис-акриламида, или любых других мономеров на их основе, находящему применение при изготовлении биологических микрочипов, использующихся в молекулярной биологии для секвенирования и картирования ДНК, детектирования мутаций и целого ряда медицинских приложений.

### Уровень техники

Известны два способа иммобилизации модифицированных непердельными группами олигонуклеотидов в гидрогеле.

Первый способ состоит в сополимеризации олигонуклеотида с присоединенным через фосфоамидную связь N-алкиламещенным метакриламидным остатком (Acrydite<sup>TM</sup>) с акриламидом и бисакриламидом. Данный реагент производится фирмой Mosaic Technologies [F. N. Rehman, M. Audeh, E. S. Abrams, P. W. Hammond, M. Kenney and T. C. Boles, *Nucleic Acids Research*, 1999. V.27, N 15, P. 649-655] и позволяет вводить метакриламидную группу в олигонуклеотид по 5'-концу в автоматическом режиме синтеза.

Данный способ имеет ряд ограничений. Несмотря на то, что метакриламидная группа устойчива как в кислой так и в щелочной областях pH фосфоамидная связь, выбранная авторами для связывания метакриламидного фрагмента с олигонуклеотидом, ограничивает область использования олигонуклеотидов с такого рода модификацией только рамками нейтральной и слабощелочной среды. Известно, что фосфоамидная связь неустойчива в кислой среде [N. N. Preobrazhenskaya, *Russ. Chem. Rev.*, 1972, 41, P.54; Chanley J.D., Feageson E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, 87, P.3199; Glark V.M., Kirby G.W., Todd A.R., *J. Chem. Soc.*, 1957, P.1497]. Поскольку олигонуклеотиды являются поликислотами, то хранение водных растворов таких олигонуклеотидов приводит, как правило, к отщеплению непердельной группы и как следствие этого к утрате способности вступать в реакцию сополимеризации. В связи с этим фирма изготовитель предлагает хранить олигонуклеотиды в сухом виде при -20°C, что сильно ограничивает рамки использования этих производных. Так, при изготовлении олигонуклеотидных микрочипов неизбежно будет возникать проблема хранения и многократного использования библиотеки олигонуклеотидов.

Таким образом, кислотолабильность фосфоамидной связи в модифицированных олигонуклеотидах выпускаемых под маркой Acrydite<sup>TM</sup> резко ограничивает область их применения.

Другим недостатком данного способа является введение непредельной группы только по 5'-концу синтезированного олигонуклеотида.

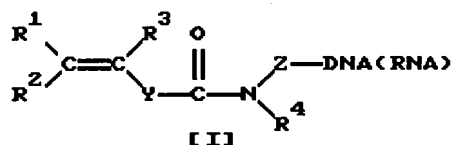
Второй описанный способ [Vasiliskov A.V., Timofeev E.N., Surzhikov S.A., Drobyshev A. L., Shick V. V., Mirzabekov A.D., BioTechniques 1999, 27, P. 592-606] устраняет некоторые недостатки первого, а именно предлагает использовать аллильные производные олигонуклеотидов, что повышает устойчивость модифицированных олигонуклеотидов к изменениям pH растворов и, тем самым, снимает ограничения, накладываемые на первый способ.

Недостатком данного способа является низкое сродство аллильного фрагмента к акриламиду и бисакриламиду в реакции сополимеризации при иммобилизации олигонуклеотида в акриламидном гидрогеле. Так, например, при изготовлении олигонуклеотидных микрочипов, в сравнении с первым способом требуется огромный избыток олигонуклеотида. Такой способ безусловно является гораздо более дорогостоящим.

#### Сущность изобретения

Сущность изобретения заключается в том, что олигонуклеотиды модифицируются различными непредельными группами, имеющими высокое сродство с непредельным мономером, составляющим основу формируемого гидрогеля (например, акриламидом, метакриламидом или любым другим мономером на их основе), позволяющими проводить эффективную иммобилизацию полученных модифицированных олигонуклеотидов в гель при непосредственном изготовлении микрочипа.

Синтетические олигонуклеотиды общей формулы [1]:



где  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$  представляет собой H, алкил  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , Ph,  $\text{PhCH}_2\text{-}$ ;

Z представляет собой  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2\text{OX}$ , где  $n=1-6$ ; или  $(\text{CH}_2)_n\text{-OX}$ , где  $n=2-6$ ; и X представляет собой фосфодиэфирную группу, связывающую непредельный фрагмент с 5'- и/или 3'-концом олигонуклеотида;

$\text{R}^4$  представляет собой H,  $(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ , где  $n=2-6$ ;

Y представляет собой  $(\text{p-C}_6\text{H}_4)_n$ , где  $n=0-2$ ;

DNA/RNA представляет собой одноцепочечный фрагмент олигонуклеотидов дезокси- и риборяда, полученный на автоматическом синтезаторе по стандартной фосфорамидитной химии; двухцепочечный фрагмент DNA, полученный в условиях полимеразной цепной реакции (PCR) с использованием синтетических праймеров с концевой непредельной группой; одноцепочечный фрагмент DNA, полученный в условиях ассиметрической полимеразной цепной реакции с использованием синтетических праймеров с концевой непредельной группой, получают с помощью соответствующего фосфоамидитного твердофазного синтеза или ацилирования синтезированного олигонуклеотида, содержащего аминоклинк, активированным эфиром непредельной кислоты в поставтоматическом режиме. Модифицированные таким образом олигонуклеотиды иммобилизуют в акриламидном геле с помощью реакции радикальной сополимеризации.

Задача настоящего изобретения состоит в разработке способа иммобилизации олигонуклеотидов, содержащих различные непредельные группы, имеющие высокое сродство с непредельным мономером, составляющим основу формируемого гидрогеля (например, акриламидом, метакриламидом или любым другим мономером на их основе) и устойчивых в условиях их использования и хранения.

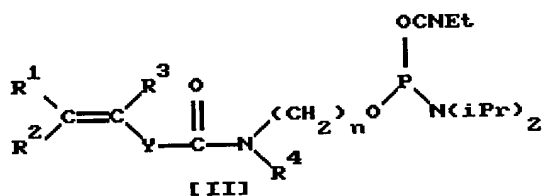
В настоящем изобретении предложено использование ряда алкил(арил) замещенных акриламидных и стирольных фрагментов, имеющих высокое сродство к акриламиду в реакции сополимеризации и способ их введения в олигонуклеотид:

использование в автоматическом режиме синтеза фосфоамидита, отличающегося от коммерческого Acrydite™ типом связи фосфора с неперделной группой (в данном случае P-O), что обуславливает значительную устойчивость получаемых продуктов в кислой области pH.

введение способом активированных эфиров неперделных групп в поставтоматическом режиме.

В автоматическом режиме введение неперделных соединений в синтетический олигонуклеотид осуществляется с помощью соответствующего фосфоамидита [Froehler B.C., Matteucci M.D., Nucleic Acids Res. 1983, 11, P. 8031-8036]. Например, замещенный N-гидроксиалкилметакриламид может быть превращен в соответствующий фосфоамидит в реакции 2-О-цианоэтил-N,N,N',N'- тетраизопропилфосфодиамидитом в ацетонитриле в присутствии тетразола. Полученный реагент в виде 0.1 М раствора в ацетонитриле используют без выделения в стандартных условиях.

В общем случае для модификации олигонуклеотидов может быть использован фосфоамидит (формулы [II]):



где R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> представляет собой H, алкил C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, Ph-, PhCH<sub>2</sub>-;

R<sup>3</sup> представляет собой алкил C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

R<sup>4</sup> представляет собой H, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-ОДМТ, где n=2-6;

Y представляет собой (p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)<sub>n</sub> где n=0-2; n=2-6;

с типом связи фосфора с неперделной группой P-O.

В поставтоматическом режиме введение неперделного остатка в олигонуклеотид осуществляется в результате реакции 4- нитрофенилового эфира соответствующей кислоты с синтезированным олигонуклеотидом, содержащим аминотерминал, по 5'- и (или) 3'-концу. 4-Нитрофениловые эфиры неперделных кислот получают в реакции с 4- нитрофенолом в присутствии дициклогексилкарбодиимида.

Способ иммобилизации олигонуклеотидов с неперделными фрагментами реализован в варианте фотополимеризации под действием УФ-излучения. Нанесение полимеризационной смеси проводится капельным способом: капли наносят на предварительно модифицированное стекло и проводят полимеризацию. Нанесение проводят либо с помощью микрошприца, либо с помощью автоматического робота для нанесения микрокапель [Froehler B. C., Matteucci M.D., Nucleic Acids Res. 1983, 11, P. 8031-8036, G.Yershov, V.Barsky, A.Belgovskiy, E.Kirilov, E.Kreindlin, I. Ivanov, S.Parinov, D.Guschin, A.Drobishev, S.Dubiley, A.Mirzabekov. Proc.Natl.AcadSci.USA. 1996, V.93, P.4913-4918], позволяющего наносить капли объемом порядка 1 нл.

Заявляемый способ позволяет получать гелевые матрицы, содержащие иммобилизованные олигонуклеотиды с высокой степенью иммобилизации в зависимости от использованной неперделной группы.

### Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Приведенные далее примеры являются предпочтительными, предназначены лишь для подтверждения возможности осуществления изобретения и не должны стать основанием для ограничения объема притязаний Заявителя. Специалист в данной области техники без труда найдет возможности иных воплощений изобретения, которые безусловно подпадают под притязания Заявителя, отраженные в формуле изобретения, приводимой ниже.

#### Пример 1. Синтез фосфоамидита, содержащего метакриламидный остаток.

В качестве примера синтеза фосфоамидита, содержащего метакриламидный остаток, приведен синтез N-метакрил-О-(2-О-цианозтил-N,N'-диизопропиламинофосфит)этанолamina согласно схеме 1. (Приведена в конце описания).

#### Синтез N-гидроксиэтилметакриламида.

4-Нитрофениловый эфир метакриловой кислоты (0.300 г, 1.45 ммоль) растворяли в ацетонитриле (20 мл). К раствору приливали этанолamin (0.182 г, 2.98 ммоль) и оставляли при комнатной температуре на 12 часов. Выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали. Продукт очищали хроматографией на колонке с силикагелем (элюент: ацетон-петролейный эфир 3:2). Выход 83%. Масло.  $R_f=0.41$  (в системе ацетон-петролейный эфир 3:2).

#### Синтез N-метакрил-О-(2-О-цианозтил-N,N'-диизопропиламино-фосфит)этанолamina

N-Гидроксиэтилметакриламид (0.013 г, 0.101 ммоль) растворяли в ацетонитриле (0.266 мл). К раствору добавляли 2-цианозтил-N,N,N',N'-тетраизопропилфосфоамидит (0.030 г, 0.101 ммоль) и 0.4 М раствор тетразола в ацетонитриле (0.255 мл). Раствор перемешивали 30 минут и отфильтровывали. К фильтрату прибавляли ацетонитрил (0.479 мл). Полученный 0.1 М раствор фосфоамидита непосредственно использовали в автоматическом синтезе олигонуклеотидов.

#### Пример 2. Синтез олигонуклеотида-CAACTGAT с 3'-концевой акриламидной группой.

В качестве примера синтеза олигонуклеотида с 3'-концевой акриламидной группой приведен синтез 5'-CAACTGAT-3'-( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NHC(O)-CH=CH}_2$ ) согласно схеме 2. (Приведена в конце описания).

#### Синтез 4-нитрофенилового эфира акриловой кислоты

Акриловую кислоту (0.850 г, 11.79 ммоль) растворяли в этилацетате (7 мл) и при перемешивании приливали раствор 4-нитрофенола (1.804 г, 12.97 ммоль) и дициклогексилкарбодиимида (2.680 г, 12.97 ммоль) в этилацетате (14 мл). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат охлаждали до  $-70^\circ\text{C}$  и выпавшие кристаллы нитрофенилового эфира отфильтровывали. Фильтрат упаривали вдвое и вновь охлаждали до  $-70^\circ\text{C}$ . Кристаллы, полученные в двух порциях, высушивали при комнатной температуре и давлении 3 мм рт.ст.

Выход 87%.  $T_{\text{пл}}=142-143^\circ\text{C}$ .

#### Синтез 5'-CAACTGAT-3'-( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NHC(O)-CH=CH}_2$ )

К раствору олигонуклеотида 5'-CAACTGAT-3'-( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$ ) (21.7 нмоль) в боратном буфере (0.050 мл) с pH 9.53 приливали раствор 4-нитрофенилового эфира акриловой кислоты (0.40 мг, 2170

нмоль) в диметилформамиде (0.100 мл). Полученный гомогенный раствор выдерживали при 35°C 12 часов. Затем гель-фильтрацией на сорбенте Sephadex-G25, с использованием в качестве элюента деионизированной воды, отделяли олигонуклеотидную фракцию от низкомолекулярных компонентов.

Олигонуклеотид очищали с помощью ВЭЖХ на приборе Gilson (США), колонка Supelco 4,6x250 мм, в системе элюентов: буфер А - 0,05М триэтиламмоний ацетат, буфер Б - 50% ацетонитрила в буфере А, градиент от 0 до 50% буфера Б за 30 мин, детекция при длине волны  $\lambda = 260$  нм. Время удерживания  $R_t$  19 мин. Выход модифицированного олигонуклеотида составил 72%.

Пример 3. Фотоиницированная сополимеризация модифицированных олигонуклеотидов.

Оценку процента иммобилизации проводили по введенной в олигонуклеотид радиоактивной метке  $P^{32}$ .

Состав полимеризационной смеси соответствовал 5% полиакриламидному гелю: 5% акриламид-бисакриламид (19:1), 40% глицерин, 2% ацетон, 1,2% ТЕМЕД, 0,1 М натрий фосфатный буфер, pH 7,0. Концентрация меченого  $P^{32}$  олигонуклеотида, 5'- $P^{32}$ -GAAAGGTGGTGTCTCTACGC-(CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)-C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>)-3' составляла  $1 \cdot 10^{-7}$  М. Капли наносили с помощью микрошприца на стекло, предварительно обработанное Bind-Silan (3-(trimethoxysilyl)-propylmethacrylate). Объем капли 0,2 мкл. Полимеризацию проводили в УФ-печи (Stratolinker 1800-UV). Время экспозиции 20 мин при длине волны 254 нм. После проведения сополимеризации измеряли суммарный радиоактивный фон стекла с нанесенными каплями, который принимали за 100%. Далее проводили серию отмывок в различных условиях до постоянного значения радиоактивного фона и оценивали средний % иммобилизации олигонуклеотида, который составил 65-70%.

Пример 4. Оценка процента иммобилизации по интенсивности флуоресценции флуоресцентной метки, введенной в сополимеризуемый олигонуклеотид.

Для определения % иммобилизации олигонуклеотида был получен 5'-Flu-GAAAGGTGGTGTCTCTACGC-(CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)-CH=CH<sub>2</sub>)-3'. Флуоресцеин вводили на 5'-конец последовательной обработкой Т4- полинуклеотидкиназой, ATP $\gamma$ S, 5-IAF (5- йодоацетамидофлуоресцеин), с последующими экстракциями фенол/хлороформом, бутанолом и очисткой HPLC. Полученный гомогенный продукт вводили в сополимеризационную смесь, стандартную для 5% полиакриламидного геля, и проводили полимеризацию в условиях, указанных в примере 3. Оценку % иммобилизации проводили аналогично определению % иммобилизации для меченого по 5'-концу радиоактивным изотопом фосфора ( $P^{32}$ ): за 100% принимали среднюю флуоресценцию 1 капли после окончания полимеризации. После отмывки в воде при 60°C, 45 мин повторно измеряли интенсивность флуоресценции и определяли средний % иммобилизации, который составил 60%. Результаты приведены на фиг. 1.

Пример 5. Влияние введенной в олигонуклеотид непредельной группы на степень сополимеризации.

Оценка степени иммобилизации проводится по связыванию комплиментарных флуоресцентно меченных олигонуклеотидов в результате гибридизации.

Показано, что все модифицированные олигонуклеотиды имеют высокую степень связывания с комплиментарным олигонуклеотидом, меченым Texas Red, при этом однако интенсивность флуоресценции распределена в исследуемом ряду таким образом: акриламидная = метакриламидная > 3-фенилакриламидная > 4-винилбензамидная. Поскольку эксперимент проводили для всех перечисленных соединений в одинаковых условиях, а именно: равные исходные концентрации всех модифицированных олигонуклеотидов в сополимеризационной смеси, одинаковые условия проведения полимеризации и последующих отмывок геля, равная концентрация комплиментарного олигонуклеотида, полученные данные позволяют сделать вывод о реакционной способности перечисленных соединений в условиях проведения сополимеризации.

Пример 6. Гибридизация на микрочипе, полученном сополимеризацией модифицированного олигонуклеотида с 5% акриламидным гелем.

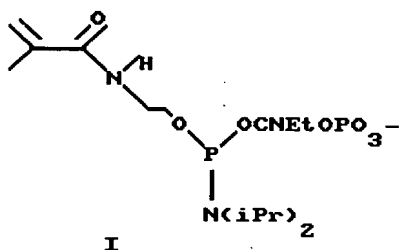
Нанесение проводили с помощью автоматического робота для нанесения микрокапель [Froehler B. C., Matteucci M.D., Nucleic Acids Res. 1983, 11, P. 8031-8036, G. Yershov, V. Barsky, A. Belgovskiy, E. Kirilov, E. Kreindlin, I. Ivanov, S. Parinov, D. Guschin, A. Drobishev, S. Dubiley, A. Mirzabekov. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996, V.93, P.4913-4918]. Наносимый объем капли соответствовал 1 нл. Концентрация 5'-CAACTGAT-(CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>OH)-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)-CH=CH<sub>2</sub>)-3' составляла 1·10<sup>-6</sup>М. Концентрация комплиментарного олигонуклеотида, меченного по 5'-концу Texas Red, составляет 3·10<sup>-6</sup>М. Результаты приведены на фиг. 2.

Пример 7. Синтез олигонуклеотидов с 3'- и 5'-концевой ненасыщенной группой.

Синтез олигонуклеотидов с 3'-концевой ненасыщенной группой, проводили согласно схеме 3. (Приведена в конце описания).

Образование целевого продукта в реакции ацилирования контролировали по данным HPLC (Rt), а брутто состав полученных олигонуклеотидов подтверждали методом MALDI-MS. (Таблица 1).

Олигонуклеотиды с 5'-концевой ненасыщенной группой синтезировали при использовании 0.1 М раствора фосфоамидита, полученного по методике,



приведенной в примере 1, на синтезаторе Biosystems 394DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems, Foster City) в условиях стандартной фосфорамидитной химии. Образование целевого продукта контролировали по данным HPLC (Rt), а брутто состав полученных олигонуклеотидов подтверждали методом MALDI-MS. (Таблица 2).

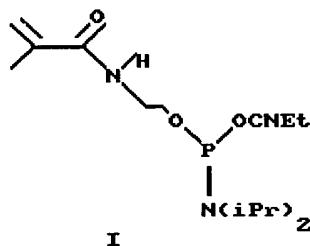
Масс-спектры регистрировали на MALDI-MS спектрометре.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC) проводили на колонке Supelco LC-18(5μm 4.6x250 mm) с использованием элюентной системы: А) 0.05М раствор триэтиламмоний ацетата; В) 0.05М раствор триэтиламмоний ацетата в 50% CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>; градиент от 0 до 50% В) за 30 минут.

Эффективность стадии конденсации с использованием фосфоамидита (1) по данным высокоэффективной хроматографии (HPLC) составила более 92%.

Пример 8. Имобилизация модифицированных непредельной группой олигонуклеотидов в различных гидрогелях на основе акриламида

Олигонуклеотид MAA-5'-GAACTGAG-3'-TexRed получали на автоматическом синтезаторе Biosystems 394DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems, Foster City). Метакриламидную группу



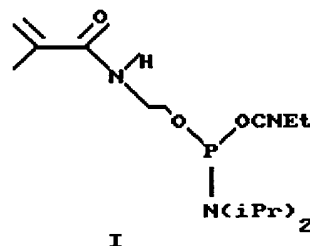
вводили в олигонуклеотид с использованием 0.1M раствора фосфорамидита, полученного по методике, приведенной в примере 1, в условиях стандартной фосфорамидитной химии.

Олигонуклеотид в составе гелей для фотоиндуцируемой полимеризации: (A,B, C, D, E, F,G) наносили с помощью автоматического робота, охарактеризованного выше, на стекло, обработанное BindSilane, облучали УФ с  $\lambda = 312$  нм и отмывали.

На фиг.3 представлена флуоресцентная картина микрочипа, полученного при иммобилизации в гидрогелях разного состава (A,B,C,D,E,F,G) олигонуклеотида структуры MAA-5'- GAACTGAG-3'-TexRed, с 5'-концевой метакриламидной группой (MAA) и флуоресцентной меткой на 3'-конце (TexRed). Эффективность иммобилизации олигонуклеотида в разных гелях определяли по величине флуоресцентного сигнала. Степень иммобилизации на разных гелях составила 30-60%.

Пример 9. Гибридикация меченых олигонуклеотидов с иммобилизованными в различных гидрогелях модифицированными непредельной группой олигонуклеотидами.

Для изготовления микрочипа синтезировали олигонуклеотиды MAA-GAACTGAG и MAA-CAACTGAC с 5'-концевой метакриламидной группой



(MAA) при использовании 0.1M раствора фосфоамидита, полученного по методике, приведенной в примере 1, на синтезаторе Biosystems 394DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems, Foster City) в условиях стандартной фосфорамидитной химии. Полученные олигонуклеотиды добавляли в составе гелей для фотоиндуцируемой полимеризации наносили с помощью автоматического робота, охарактеризованного на стр.6, на стекло, обработанное BindSilane, облучали УФ с  $\lambda = 312$  нм, отмывали и использовали для проведения гибридикационного анализа. Использовали гидрогели следующего состава: A{акриламид:N,N'-метилденбис-акриламид-T10%, C5%, глицерин-64.5%}; B {акриламид:N,N'-метилденбисакриламид-T5%, C5%, глицерин-64.5%}, C {(акриламид+N- [трис(гидроксиметил)метил]акриламид(1:3))

(N, N'-метилденбисакриламид+N, N'-(1,2-дигидроксиэтил-акриламид))(3: 7), T5%, C25%; глицерин-64.5%}.

На фиг. 4 представлены результаты гибридикации на олигонуклеотидном микрочипе с использованием иммобилизованных олигонуклеотидов структуры GAACTGAG и CAACTGAC и гибридируемого олигонуклеотида структуры CTCAGTTC. Полученная гибридикационная картина соответствует теоретическим представлениям. Большой флуоресцентный сигнал наблюдается на иммобилизованном олигонуклеотиде-GAACTGAG, полностью комплиментарном гибридируемой пробе, независимо от вида используемого геля и линкера, соединяющего метакриламидную группу с олигонуклеотидом. Меньший сигнал наблюдается на ячейках с иммобилизованным олигонуклеотидом CAACTGAC, содержащим концевые замены.



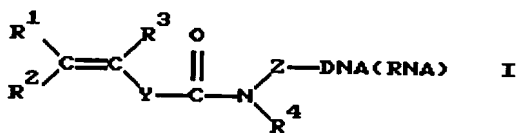
Пример 10. Иммунизация модифицированных неопределенной группой олигонуклеотидов в различных гидрогелях.

Олигонуклеотид в составе гелей для фотоиндуцируемой полимеризации (А,В) наносили с помощью автоматического робота, охарактеризованного выше, на стекло, обработанное BindSilane, облучали УФ с  $\lambda = 312$  нм и отмывали. Эффективность иммобилизации олигонуклеотида определяли по величине флуоресцентного сигнала на чипе до и после отмывки чипа. На фиг. 5 представлена флуоресцентная картина микрочипа, полученного при иммобилизации в гидрогелях разного состава (А, В) олигонуклеотида: МAA-5'- GAACTGAG-3'-TexRed, с 5'-концевой метакриламидной группой (МAA) и флуоресцентной меткой на 3'-конце (TexRed). Процент иммобилизованного олигонуклеотида составил в геле А-75-80%, в В-68-76%.

Данный пример показывает, что олигонуклеотиды с концевой ненасыщенной группой можно эффективно иммобилизовать не только в гидрогелях на основе акриламида и N,N'-метилена бисакриламида, но и на основе любых других водорастворимых мономеров, способных эффективно сополимеризоваться с концевой ненасыщенной группой олигонуклеотида.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ иммобилизации олигонуклеотидов в полимерных гидрогелях, включающий сополимеризацию модифицированных олигонуклеотидов с неопределенными мономерами при формировании полимерных гелей, в котором высокая степень иммобилизации достигается путем использования модифицированных неопределенными группами олигонуклеотидов общей формулы I



где  $R^1, R^2, R^3$  представляют собой H, алкил  $C_1-C_6$ , Ph,  $PhCH_2-$ ;

Z представляет собой  $(CH_2)_n CH(CH_2OH)CH_2OX$ , где  $n=1-6$ ; или  $(CH_2)_n -OX$ , где  $n=2-6$ , и X представляет собой фосфодиэфирную группу, связывающую неопределенный фрагмент с 5'- и/или 3'-концом олигонуклеотида;

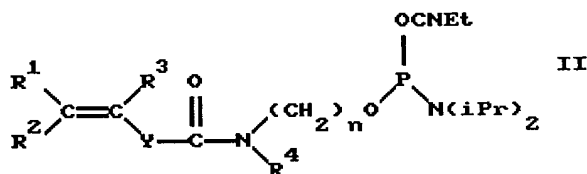
$R^4$  представляет собой H,  $(CH_2)_n OH$ , где  $n=2-6$ ;

Y представляет собой  $(p-C_6H_4)_n$ , где  $n=0-2$ .

2. Способ по п.1, в котором полимерный гидрогель представляет собой полиакриламидный гель, получаемый сополимеризацией неопределенных мономеров акриламида и бис-акриламида, или любых других мономеров на их основе.

3. Способ по п.1, в котором олигонуклеотиды модифицируют неопределенными группами в автоматическом режиме.

4. Способ по п.3, в котором олигонуклеотиды модифицируют неопределенными группами с помощью фосфоамидита общей формулы II



где  $R^1$ ,  $R^2$  представляют собой H, алкил  $C_1-C_6$ , Ph,  $PhCH_2$ ;

$R^3$  представляет собой алкил  $C_1-C_6$ ;

$R^4$  представляет собой H,  $(CH_2)_n$ -ОДМТ, где  $n=2-6$ ;

Y представляет собой  $(p-C_6H_4)_n$ , где  $n=0-2$ ,

$n=2-6$ ;

с типом связи фосфора с непредельной группой P-O.

5. Способ по п. 1, в котором олигонуклеотиды модифицируют непредельными группами в поставтоматическом режиме.

6. Способ по п. 5, в котором олигонуклеотиды модифицируют непредельными группами путем ацилирования олигонуклеотида, содержащего аминоклинк, активированным эфиром непредельной кислоты.

7. Способ по п. 6, в котором активированный эфир непредельной кислоты представляет собой нитрофениловый эфир.

8. Способ по п. 3 или 5, в котором олигонуклеотиды модифицируют непредельными группами по 5'-концу олигонуклеотида.

9. Способ по п. 3 или 5, в котором олигонуклеотиды модифицируют непредельными группами по 3'-концу олигонуклеотида.

10. Способ по п. 1, в котором олигонуклеотиды иммобилизуют путем фотосополимеризации под действием УФ-излучения.

11. Способ по п. 10, в котором фотосополимеризацию проводят капельным способом путем нанесения капель на предварительно модифицированное стекло.

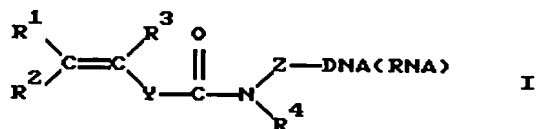
12. Способ по п. 11, в котором капли наносят с помощью микрошприца.

13. Способ по п. 12, в котором объем капель составляет около 0,2 мкл.

14. Способ по п. 11, в котором капли наносят с помощью автоматического робота для нанесения микрокапель.

15. Способ по п. 14, в котором объем капель составляет около 1 нл.

16. Олигонуклеотид, модифицированный непредельными группами общей формулы I



где  $R^1, R^2, R^3$  представляют собой H, алкил  $C_1-C_6$ , Ph,  $PhCH_2-$ ;

Z представляет собой  $(CH_2)_n CH(CH_2OH)CH_2OX$ , где  $n=1-6$ ; или  $(CH_2)_n-OX$ , где  $n=2-6$ , и X представляет собой фосфодиэфирную группу, связывающую неопределённый фрагмент с 5'- и/или 3'-концом олигонуклеотида,

$R^4$  представляет собой H,  $(CH_2)_n OH$ , где  $n=2-6$ ;

Y представляет собой  $(p-C_6H_4)_n$ , где  $n=0-2$ .

17. Олигонуклеотид по п. 16, модифицированный неопределённой группой по 5'-концу.

18. Олигонуклеотид по п. 16, модифицированный неопределённой группой по 3'-концу.

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**